

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



EPO - DG 1

31. 01. 2005

(83)

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 53 419.9

**Anmeldetag:** 09. November 2003

**Anmelder/Inhaber:** Epigenomics AG, 10435 Berlin/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA-Sequenzen mittels hemimethylierungssensitiver Restriktionsenzyme

**IPC:** C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Januar 2005  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

*Hois*

BEST AVAILABLE COPY

**Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in  
DNA-Sequenzen mittels hemimethylierungssensitiver Re-  
striktionsenzyme**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung von Cytosinmethylierungen in DNA-Sequenzen.

**Hintergrund der Erfindung**

10

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryontischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four:

15

History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek, eds.: The Epigenome. Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis

20

der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht

25

die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

30

Die gebräuchlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (Bisulfit-Behandlung), zum anderen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt. Die enzymatisch oder

chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff).

5 Die herkömmlichen Verfahren leiden unter mehreren Nachteilen. So ist die Bisulfitbehandlung zeit- und arbeitsaufwendig. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die DNA nur unvollständig umgesetzt und außerdem zum Teil de-  
10 gradiert wird. Eine Quantifizierung ist sowohl bei der chemisch wie bei der enzymatisch vorbehandelten DNA schwierig. Erforderlich hierzu ist eine Amplifikation, meist eine PCR. Dieser zusätzliche Arbeitsschritt ist mit mehreren Problemen verbunden, etwa der Gefahr einer bevorzugten Amplifikation bestimmter Sequenzen (sog. „Bi-  
15 as“).

Das erfindungsgemäße Verfahren erfordert dagegen keine Amplifikation und erlaubt so eine schnellere und einfachere Analyse als die herkömmliche Methodik. Es ermöglicht zudem eine Quantifizierung. Im erfindungsgemäßen  
20 Verfahren wird die zu untersuchende DNA mit Oligonukleotiden eines definierten Methylierungszustandes hybridisiert. Dabei entstehen je nach Methylierungsstatus der zu untersuchenden DNA und der Oligonukleotide Hybride, die  
25 auf beiden DNA-Strängen entweder den gleichen oder einen unterschiedlichen Methylierungszustand besitzen. Anschließend werden die Hybride mit Restriktionsenzymen umgesetzt, wobei die Restriktion von dem Methylierungszustand der Hybride abhängig ist. Über unterschiedliche  
30 Detektionsmöglichkeiten kann dann auf den Methylierungsstatus der DNA geschlossen werden.

Eine Hybridbildung und eine anschließende, unterschiedliche Restriktion der unterschiedlich methylierten Hybride wird auch bei dem sog. Genomic Mismatch Scanning (GMS) benutzt. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren zur Detektion von Polymorphismen. Dabei werden die DNA-Stränge zweier unterschiedlicher Individuen miteinander hybridisiert, wobei die DNA eines Individuums zuvor durch Einsatz von Enzymen künstlich methyliert wurde. Die entstandenen Homohybride werden dann anschließend enzymatisch verdaut, während die Heterohybride weiter analysiert werden (siehe etwa: Nelson et al.: Genomic mismatch scanning: a new approach to genetic linkage mapping. Nat Genet. 1993 May;4(1):11-8). Die künstliche Methylierung und die anschließende Restriktion dienen hier also der Isolierung der Heterohybride. Eine Nutzung der unterschiedlichen Restriktion unterschiedlich methylierter DNA-Hybride zur quantitativen Analyse der natürlichen DNA-Methylierungsmuster ist bisher noch nicht beschrieben.

### Beschreibung

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird die zu untersuchende DNA mit Oligonukleotiden eines definierten Methylierungsstatus hybridisiert und anschließend mit bestimmten Restriktionsenzymen umgesetzt. Die Restriktionsenzyme sind in der Lage, CpG-Sequenzen zu erkennen und zudem hemimethylierte DNA-Doppelstränge entweder von unmethylierten oder von homomethylierten DNA-Doppelsträngen zu unterscheiden. Diese Restriktionsenzyme werden im folgenden als *hemimethylierungssensitiv* bezeichnet. Die Begriffe *hemimethyliert*, *homomethyliert*, *unmethyliert* und *definierter Methylierungsstatus* sind wie folgt zu verstehen: Sind die Cytosine in den zu untersuchenden CpG-Position

methyliert, so bilden sie mit Oligonukleotiden, deren entsprechende CpG-Position nicht methyliert ist, Doppelstränge, bei denen diese spezielle CpG-Position nur auf einem Strang methyliert (hemimethyliert) ist. Das gleiche gilt für Hybride aus entsprechend methylierten Oligonukleotiden und unmethylierter zu untersuchender DNA. Sind dagegen sowohl Oligonukleotid wie auch DNA an der CpG-Position methyliert, so resultiert ein auf beiden Seiten methylierter Doppelstrang (Homomethylierung). Umgekehrt entstehen, wenn die CpG-Positionen sowohl in der zu untersuchenden DNA wie auch im Oligonukleotid unmethyliert sind, unmethylierte Doppelstränge. Die Begriffe hemimethyliert, homomethyliert und unmethyliert beschreiben im folgenden also nicht den Gesamt-Methylierungszustand der DNA, sondern nur den Zustand an einzelnen CpG-Positionen innerhalb der DNA. Unter einem definierten Methylierungsstatus ist zu verstehen, dass die Cytosine der eingesetzten Oligonukleotide in den CpG-Positionen, die den zu untersuchenden CpG-Positionen in der DNA entsprechen, entweder unmethyliert oder an der 5-Position methyliert vorliegen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Methylierungsanalyse besteht aus folgenden vier Schritten:

- a) die zu untersuchende DNA wird an Oligonukleotide eines definierten Methylierungsstatus hybridisiert,
- b) die Hybride werden mit mindestens einem hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym umgesetzt,
- c) es wird detektiert, ob eine Restriktion stattgefunden hat,

d) es wird auf den Methylierungszustand der untersuchten DNA geschlossen.

5 Im ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die zu untersuchende DNA an Oligonukleotide hybridisiert. Dies kann sowohl in Lösung wie auch an einer Festphase erfolgen. Die zu untersuchende DNA kann aus unterschiedlichen Quellen stammen. Für diagnostische Zwecke können als Ausgangsmaterial u.a. Gewebeproben, aber auch Körperflüssigkeiten, insbesondere Serum, dienen. Denkbar ist auch, die DNA aus Sputum, Stuhl, Urin oder Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit zu verwenden. Bevorzugt wird die DNA aus den biologischen Proben isoliert. Die DNA-Extraktion erfolgt nach Standardmethoden, aus Blut etwa 10 unter Verwendung des Qiagen UltraSens DNA Extraktions-Kits. Die isolierte DNA wird dann etwa durch Umsatz mit herkömmlichen (nicht hemimethylierungssensitiven) Restriktionsenzymen fragmentiert. Die Reaktionsbedingungen und die in Frage kommenden Enzyme sind dem Fachmann bekannt und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern 15 mitgelieferten Protokollen.

20 Je nach dem später zu verwendenden Restriktionsenzym sind die Oligonukleotide an den Cytosin-Positionen, die von dem Restriktionsenzym erkannt werden, unmethyliert oder 25 an der 5-Position methyliert. Für eine quantitative Analyse werden sowohl methylierte wie auch unmethylierte Oligonukleotide eingesetzt (s.u.). Die Synthese von entsprechend unmethylierten und methylierten Oligonukleotiden gehört zum Stand der Technik. In einer weiteren bevorzugten Variante werden mehrere Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz verwendet, so dass eine Untersuchung 30

mehrerer Methylierungspositionen gleichzeitig möglich ist.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform tragen die Oligonukleotide zudem mindestens eine nachweisbare Markierung. Dabei ist dem Fachmann eine Vielzahl möglicher Markierungen bekannt. So können etwa Farbstoffe, Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide, elektrische Ladungsträger oder im Massenspektrometer nachweisbare Markierungen eingesetzt werden. Denkbar sind auch Peptid-Markierungen, die indirekt durch Bindung eines anders markierten Antikörpers nachgewiesen werden. Es sind auch chemische Markierungen möglich, die durch nachfolgende Umsetzung mit einem anders markierten Markermolekül sichtbar gemacht werden. 10 Viele andere Markierungsmöglichkeiten gehören ebenfalls zum Stand der Technik. Bevorzugt tragen die Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz oder unterschiedlichen Methylierungsstatus unterschiedliche Markierungen. 15

20 In einer besonders bevorzugten Variante trägt das Oligonukleotid auf der einen Seite der Restriktionsstelle einen Fluoreszenzfarbstoff und auf der anderen Seite einen sog. „Quencher“. Erfolgt eine Restriktion, so werden Farbstoff und Quencher getrennt, so dass das Farbstoffsignal detektiert werden kann (Abb.1). Einsetzbare Farbstoffe und Quencher sind dem Fachmann bekannt. 25

Die Oligonukleotide sind bevorzugt an eine Festphase gebunden. Die Art der Festphase und der Festphasenkopplung sind Stand der Technik. So kann es sich bei den Festphasen etwa um funktionalisierte Polymere, Metalle, Glas oder Halbleiter wie Silicium handeln. Das Anbinden der O- 30

lignonukleotide kann u.a. über bifunktionale Linkermoleküle erfolgen, die an eine silanisierte Oberfläche gebunden werden oder etwa über Thioate oder Thiolmodifikationen im Oligonukleotid an Bromacetyl-derivatisierte Oberflächen oder Gold. Bevorzugt sind die Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz oder unterschiedlichen Methylierungsstatus räumlich soweit voneinander entfernt, dass eine getrennte Detektion möglich ist.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Oligonukleotide auf eine sensitive Oberfläche aufgebracht, deren physikalische oder chemische Eigenschaften sich bei einer Restriktion meßbar verändern. Zu diesen meßbaren Eigenschaften gehören etwa die Leitfähigkeit, die Eigenfrequenz oder die Oberflächenspannung. In einer besonders bevorzugten Variante besteht diese Oberfläche aus einem Piezo-Kristall. Die Anbindung von DNA an Piezo-Kristalle ist dem Fachmann bekannt (zur Übersicht: Skladal: Piezoelectric Quartz Crystal Sensors Applied for Bioanalytical Assays and Characterisation of Affinity Interactions, J. Braz. Chem. Soc., Vol.14, Nr.4, 491-502, 2003).

Die Hybrisierung der Oligonukleotide mit der zu untersuchenden DNA erfolgt unter Standardbedingungen.

Im zweiten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Hybride mit hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzymen umgesetzt. Die Auswahl der Restriktionsenzyme erfolgt nach der Sequenzspezifität der Enzyme und nach der zu untersuchenden diagnostischen oder wissenschaftlichen Fragestellung. Bevorzugt werden dabei Enzyme einge-



setzt, die unmethylierte und hemimethylierte DNA bevorzugt gegenüber homomethylierter DNA schneiden. Geht man in diesem Fall von methylierten Oligonukleotiden aus, so können methylierte und unmethylierte Cytosinpositionen in der zu untersuchenden DNA unterschieden werden. Denn die methylierte DNA bildet mit den methylierten Oligonukleotiden homomethylierte Hybride, die von dem Restriktionsenzym nicht geschnitten werden. Bei unmethylierter DNA entstehen dagegen hemimethylierte Hybride, die vom dem Restriktionsenzym erkannt und umgesetzt werden. Geht man dagegen von unmethylierten Oligonukleotiden aus, so entstehen mit der methylierten DNA hemimethylierte Hybride und mit der unmethylierten DNA unmethylierte Hybride. Beide Hybride werden von dem Enzym geschnitten, so dass eine Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA bei Verwendung nicht-methylierter Oligos in diesem Fall nicht möglich ist. Der Einsatz der nicht-methylierten Oligonukleotide neben dem Einsatz methylierter Oligonukleotide derselben Sequenz erlaubt jedoch eine Quantifizierung des Verfahrens. Aus dem Verhältnis beider Signale läßt sich das Verhältnis zwischen Gesamt DNA und methylierter DNA berechnen. Eine solche Quantifizierung ist einfach möglich, etwa wenn methylierte und unmethylierte Oligonukleotide mit unterschiedlichen Markierungen versehen oder wenn sie räumlich getrennt an eine Festphase gebunden sind (Abb.2). Dem Fachmann ist bekannt, wie er Angaben zu Enzymen erhält, die in dieser Ausführungsform einsetzbar sind. Insbesondere bietet die REBASE-Datenbank (<http://rebase.neb.com/>) vielfältige Informationen zu hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzymen. Bevorzugt ist die Verwendung der folgenden Enzyme: AcsII; AdeI; AscI; HinPI; ClaI; EciI; HinPII; Hpy99I; NruI;

RsrII; SalI. Die Restriktionsstellen dieser Enzyme sind im Anhang aufgeführt. Reaktionsbedingungen der enzymatischen Umsetzung sind Stand der Technik und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern gelieferten Protokollen.

5

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Enzyme eingesetzt, die bevorzugt unmethylierte DNA gegenüber hemimethylierter und homomethylierter DNA schneiden. Erforderlich ist dann die Verwendung unmethylierter Oligonukleotide (bzw. zur Quantifizierung zusätzlich der Einsatz methylierter Oligonukleotide). Nähere Informationen zu einsetzbaren Enzymen sind über die oben genannten Quellen verfügbar.

10

15

Sofern entsprechende Enzyme zur Verfügung stehen, ist es prinzipiell auch denkbar, mit Enzymen zu arbeiten, die keine unmethylierte, aber hemimethylierte und homomethylierte DNA bzw. keine unmethylierte und hemimethylierte, aber homomethylierte DNA schneiden.

20

Es ist naheliegend, dass für das erfindungsgemäße Verfahren auch biologisch aktive Fragmente oder Modifikationen der Enzyme eingesetzt werden können. Mit zunehmendem Erfolg des Enzymdesigns ist auch die Verwendung speziell zum Zwecke dieser Erfindung konstruierter Enzyme denkbar.

25

Erfindungsgemäß ist es auch, mehrere unterschiedliche Restriktionsenzyme gleichzeitig oder nacheinander in Kombination mit verschiedenen Oligonukleotiden einzusetzen, um so den Methylierungszustand mehrerer unterschiedlicher Cytosinpositionen zu untersuchen.

30

Im dritten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Detektion. Dieser Schritt erfolgt je nach Versuchsansatz nach dem Stand der Technik. Werden markierte Oligonukleotide eingesetzt, so können die Markierungen entweder der ungeschnittenen Oligonukleotide oder der Restriktionsfragmente detektiert werden. Bei einer Festphasenanwendung ist es zudem möglich, die Restriktionsfragmente nachzuweisen, die sich in Lösung befinden oder die Fragmente, die an der Festphase gebunden sind (etwa bei Verwendung eines Quenchers). Bei Kopplung der Oligonukleotide an eine sensitive Oberfläche werden die sich durch die Restriktion verändernden chemischen oder physikalischen Eigenschaften gemessen.

Aus dem detektierten Signal wird dann im vierten Schritt auf den Methylierungsstatus der DNA geschlossen und der Anteil der methylierter DNA bestimmt.

Werden krankheitsspezifische Cytosinpositionen untersucht, so eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere auch zur Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten. Hierzu gehören u.a. CNS-Fehlfunktionen, Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion,

Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außerdem zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung hemimethylierungssensitiver Restriktionsenzyme zur Methylierungsanalyse und zum Nachweis der oben genannten, mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, insbesondere die Verwendung der Enzyme: AccII; AdeI; AscI; HinfI; ClaI; EciI; HinfII; Hpy99I; NruI; RsrII; SalI zu den oben genannten Zwecken.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht in einem Teststreifen, auf dem Oligonukleotide mit einem unterschiedlichen Methylierungsstatus und/ oder einer unterschiedlichen Sequenz immobilisiert sind. Dieser Teststreifen wird in einer temperierten Minikammer mit der zu untersuchenden DNA hybridisiert. Restriktion und Detektion erfolgen anschließend in einem Schritt, etwa in einer Küvette, in der die Absorptionsspektren der verwendeten Farbstoffe gemessen werden (Abb.3). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform diffundieren die Restriktionsfragmente zu einer weiteren Phase und führen dort zu nachweisbaren Folgereaktionen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus unterschiedlichen, immobilisierten Oligonukleotiden, mindestens einem hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym und den erforderlichen Restriktionspuffern.

#### Anwendungsbeispiel

Das folgende Beispiel soll die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Charakterisierung von Tumoren veranschaulichen. Ein Tumor tritt in zwei unterschiedlichen Typen (A und B) auf, die jeweils eine unterschiedliche Behandlung erfordern. Die beiden Typen sind jedoch nicht ohne weiteres aufgrund morphologischer Merkmale zu diagnostizieren; sie unterscheiden sich aber durch ihren Methylierungsstatus: ein CpG-Basenpaar, das innerhalb der Basenfolge GCGC in der Mitte eines bekannten Sequenzkontextes liegt, ist in Tumortyp A methyliert, während es im Typ B nicht methyliert vorliegt. Zur Untersuchung wird die DNA aus dem Tumorgewebe mit einem kommerziell erhältlichen Kit extrahiert. Es erfolgt eine thermische Denaturierung der DNA und eine anschließende Hybridisierung mit einer exakten 1:1 Mischung der beiden synthetischen Oligomere C und D. Diese besitzen die gleiche Basensequenz (komplementär zu der zu untersuchenden DNA), unterscheiden sich jedoch im Methylierungsstatus. Das CpG, das dem CpG entspricht, dessen Methylierung bestimmt werden soll, ist bei C unmethyliert, bei D methyliert. C und D tragen unterschiedliche Fluoreszenz-Farbstoff-Quencher-Kombinationen, wobei sich jeweils an einem Ende des Oligonukleotids der Farbstoff und an dem anderen Ende ein Quencher befindet, der eine Detektion des Farbstoffs verhindert. Nach der Hybridisierung erfolgt eine Restriktion der gebil-

deten DNA-Oligonukleotid-Hybride. Dazu wird zu der DNA eine hohe Menge des hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym *HinPI* hinzugefügt. Dieses Enzym schneidet im Sequenzkontext GCGC hemimethylierte und unmethylierte DNA, nicht jedoch homomethylierte DNA. Mit Hilfe eines temperierten Fluoreszenzphotometers wird die Zunahme der beiden (nicht mehr durch den Quencher blockierten) Farbstoffe bei Fortschritt der Reaktion mit der Zeit gemessen. Nur die Kombination aus methylierter DNA aus dem Tumorgewebe mit methylierten Oligomeren, in diesem Falle also A und D, führt zu beidseitig methylierter DNA. Diese DNA wird von dem Restriktionsenzym nicht geschnitten, so dass kein Farbstoff freigesetzt wird. Der Anteil der methylierten DNA in der untersuchten Tumorprobe läßt sich durch das Verhältnis der freigesetzten Farbstoff der beiden Oligonukleotide D und C bestimmen. Dieser Wert erlaubt eine Aussage über den Tumortyp und somit eine optimale Behandlung.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

Fig.1 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung unter Verwendung eines Farbstoff-Quencher-Paares. Dabei ist ein methyliertes Oligonukleotid an eine Festphase gebunden. Das Oligonukleotid trägt einen Farbstoff (Fünfeck) und einen Quencher (Viereck). Die zu untersuchende DNA wird an die Oligonukleotide hybridisiert. Anschließend erfolgt der Umsatz mit einem Restriktionsenzym. Ist die zu untersuchende DNA unmethyliert, so wird das Hybrid geschnitten. Farbstoff und Quencher werden getrennt, und ein Signal kann detektiert werden.

Fig.2 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Dabei werden zwei unterschiedliche Typen von Oligonukleotiden verwandt. Beide Oligonukleotide haben die gleiche Basensequenz. Sie unterscheiden sich allerdings in ihrem Methylierungsstatus und tragen unterschiedliche Farbstoffe (Kreis bzw. Fünfeck). An die Oligonukleotide wird die zu untersuchende DNA hybridisiert. Anschließend erfolgt eine Restriktion. Aus dem Verhältnis der Farbstoffsignale läßt sich der Methylierungsgrad der Probe (M) bestimmen.

Fig. 3 zeigt schematisch eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Dabei wird der Methylierungsstatus ein Tumorseite mittels eines Teststreifens untersucht. Dazu wird die aus der Probe extrahierte DNA an auf einen Teststreifen fixierte Oligonukleotide hybridisiert (Schritt 1). Anschließend erfolgt eine Restriktion mit einem hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym. (Schritt 2). Je nach Methylierungsstatus der zu untersuchenden DNA ergeben sich unterschiedliche Farbmuster (A, B und C, Schritt 3). Aus früheren Experimenten ist bekannt, welche Methylierungsmuster mit bestimmten Typen des Tumors assoziiert sind (4). Durch Vergleich mit diesen Daten lässt sich eine Aussage über eine erfolgversprechende Tumorthapie herleiten.

#### Anhang: Hemimethylierungssensitive Restriktionsenzyme

Die unten aufgeführten Enzyme zeigen eine Auswahl von möglichen, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbaren Enzymen. Die Restriktionsstellen sind der REBASE-Datenbank entnommen. Die auf der linken Seite dargestellten Konformationen werden geschnitten. In der Mitte ist

die Restriktion verlangsamt und auf der rechten Seite ganz blockiert.

Tabelle 1

5

Aboir	
	CCGC
	GGCG
	m5
m5	
CCGC	
GGCG	
	m5
	CCGC
	GGCG
	m5
	m5
	CCGC
	GGCG
Aboir	
m5	
CACHNNGTG	
GTGNNNCAC	
	m5
	CACHNNGTG
	GTGNNNCAC
	m5



---

ABCI

NS  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G

NS  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
NS

NS  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
NS

NS NS  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
NS NS

NS  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G

NS  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
NS

NS  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
NS

---

RinPI

NS  
G C G C  
C G C G

NS  
G C G C  
C G C G  
NS

---

Clai

NS  
A T C G A T  
T A G C T A

NS  
A T C G A T  
T A G C T A  
NS

---

---

ESL1

GGCGGA  
CCGCCT  
m5

GGCGGA  
CCGCCT  
m5

m5  
GGCGGA  
CCGCCT

m5  
GGCGGA  
CCGCCT  
m5

m5  
GGCGGA  
CCGCCT  
m5 m5

m5  
GGCGGA  
CCGCCT  
m5

---

RINPLI

m5  
GGCG  
CCCG

m5  
GGCG  
CCCG  
m5

m5  
GGCG  
CCCG

m5  
GGCG  
CCCG  
m5

m5  
GGCG  
CCCG  
m5

---

Rpy99I

m5  
CGWCG  
GCWGC

m5  
CGWCG  
GCWGC  
m5

m5 m5  
CGWCG  
GCWGC  
m5 m5

---

---

NruI

ms  
TGGCGA  
AGCGCT

ms  
TGGCGA  
AGCGCT  
ms

ms ms  
TGGCGA  
AGCGCT  
ms ms

ms  
TGGCGA  
AGCGCT

ms  
TGGCGA  
AGCGCT  
ms

---

NruII

ms  
CGGFCG  
GCCGCG

ms  
CGGFCG  
GCCGCG  
ms

ms ms  
CGGFCG  
GCCGCG  
ms ms

---

SalI

ms  
GTCGAC  
CAGCTG

ms  
GTCGAC  
CAGCTG  
ms

ms ms  
GTCGAC  
CAGCTG

ms  
GTCGAC  
CAGCTG

ms  
GTCGAC  
CAGCTG  
ms

ms  
GTCGAC  
CAGCTG  
ms

# Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Untersuchung von Cytosinmethylierungen in DNA-Sequenzen, dadurch gekennzeichnet, dass
  - a) die zu untersuchende DNA an Oligonukleotide eines definierten Methylierungsstatus hybridisiert wird,
  - b) die Hybride mit mindestens einem hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym umgesetzt werden,
  - 10 c) detektiert wird, ob eine Restriktion stattgefunden hat,
  - d) auf den Methylierungszustand der untersuchten DNA geschlossen wird.
- 15 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide an eine feste Phase gebunden sind.
- 20 3. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide mindestens eine nachweisbare Markierung tragen.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide mit einem Farbstoff und einem Quencher markiert sind, die bei einer Restriktion getrennt werden.
- 30 5. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass gleichzeitig sowohl methylierte wie auch unmethylierte Oligonukleotide derselben Sequenz verwendet werden.
- 35 6. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die methy-

lierten und unmethylierten Oligonukleotide unterschiedliche Markierungen tragen.

- 5 7. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz verwendet werden.
- 10 8. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide an einer sensitiven Oberfläche immobilisiert sind, deren physikalische oder chemische Eigenschaften sich bei einer Restriktion messbar verändern.
- 15 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den veränderbaren Eigenschaften um Leitfähigkeit, Eigenfrequenz oder Oberflächenspannung handelt.
- 20 10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 8 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Oberfläche um einen Piezo-Kristall handelt.
- 30 11. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Restriktionsenzym verwandt wird, dass unmethylierte und hemimethylierte DNA bevorzugt gegenüber homomethylierter DNA schneidet.
- 35 12. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym folgender Gruppe entnommen ist: AcsII; AdeI; AscI; HinPI; ClaI; EciI; HinPII; Hpy99I; NruI; RsrII; SalI.

13. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11 , dadurch gekennzeichnet, dass ein Restriktionsenzym verwandt wird, dass unmethylierte DNA bevorzugt gegenüber hemimethylierter und homomethylierter DNA schneidet.
14. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere unterschiedliche Restriktionsenzyme gleichzeitig oder nacheinander eingesetzt werden.
15. Verwendung der Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14 zur Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Cytosin-Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
16. Verwendung von hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzymen zur Methylierungsanalyse, insbesondere zur Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Cytosin-Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
17. Verwendung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass eines der folgenden Restriktionsenzyme verwendet wird: AcsII; AdeI; AscI; HinPI; ClaI; EciI; HinPII; Hpy99I; NruI; RsrII; SalI.
18. Ein Teststreifen, auf dem Oligonukleotide mit einem unterschiedlichen Methylierungsstatus und/ oder einer

unterschiedlichen Sequenz immobilisiert sind, und der Restriktion und Detektion in einem Schritt erlaubt.

- 5 19. Ein Kit, bestehend aus immobilisierten Oligonukleotiden, mindestens einem hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym und den erforderlichen Restriktionspuffern.

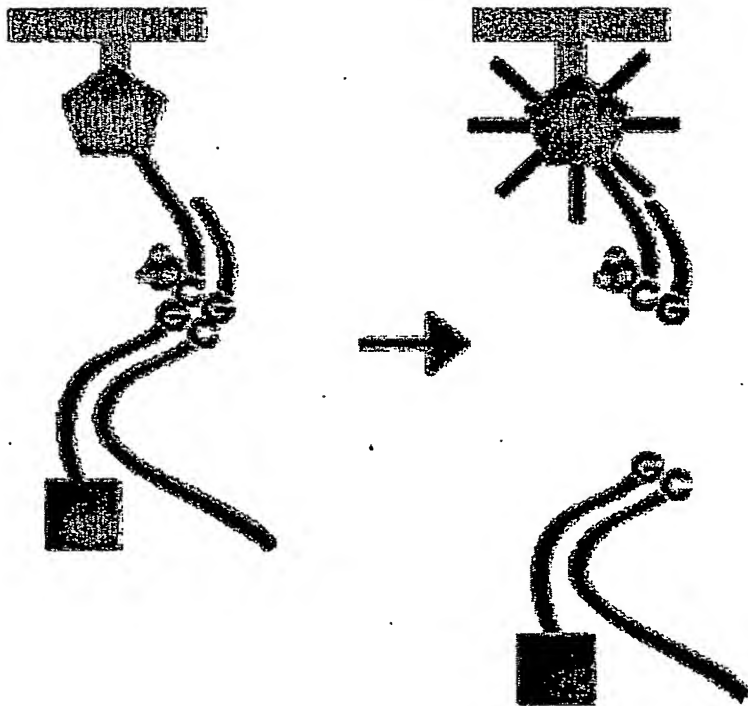
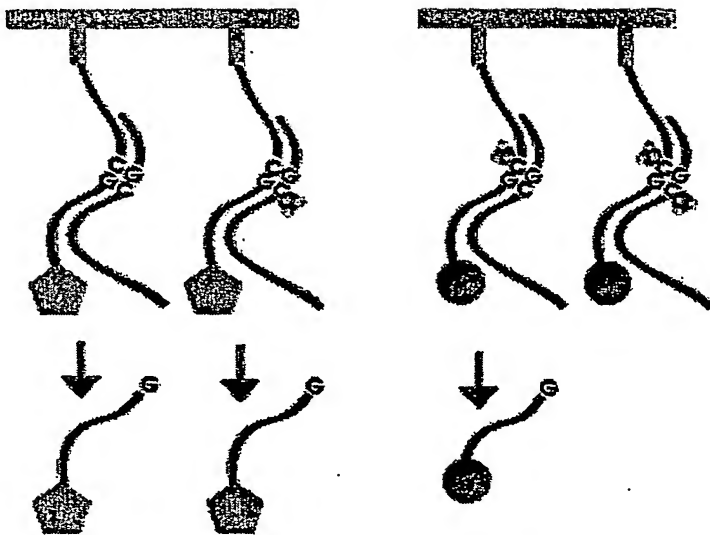
*Fig. 1*

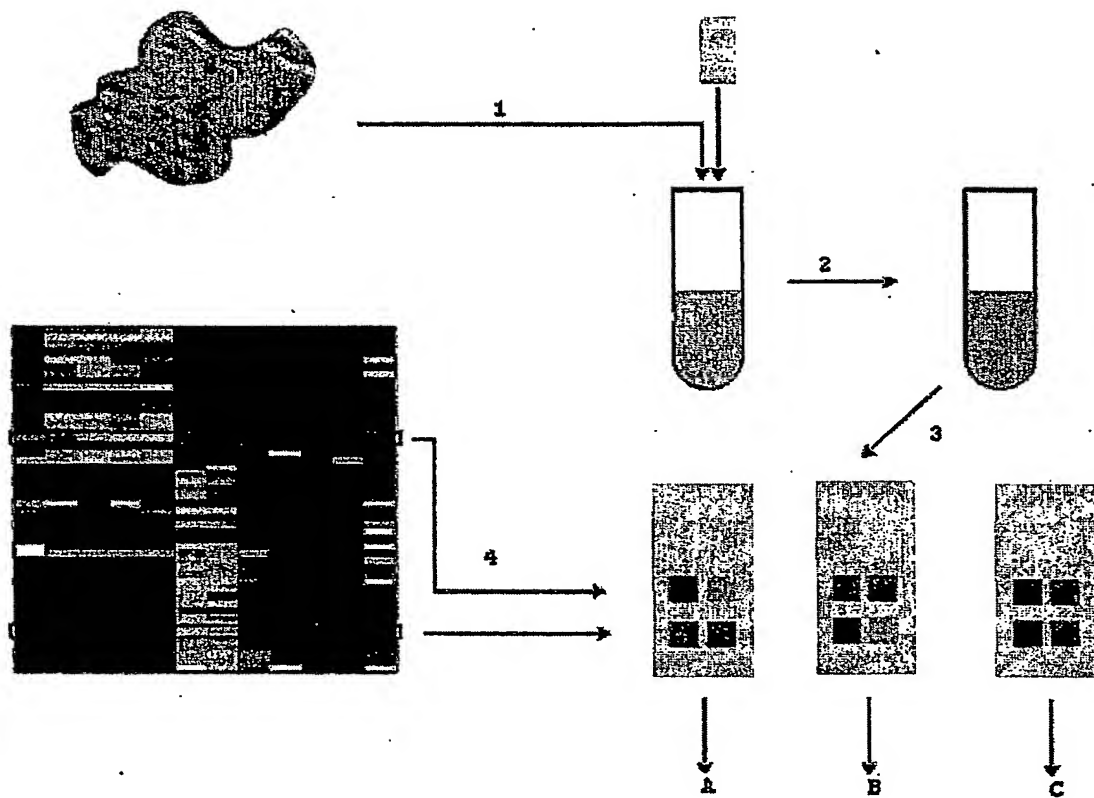


Fig. 2



$$M = 1 - \frac{\text{cup}}{\text{cup}}$$

Fig. 3



## Zusammenfassung

Die folgende Erfindung betrifft ein enzymatisches Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA-Sequenzen. Dabei wird die zu untersuchende DNA an Oligonukleotide hybridisiert. Die Hybride werden mit Restriktionsenzymen umgesetzt, die in der Lage sind, hemimethylierte DNA-Doppelstränge entweder von unmethylierten oder von homomethylierten DNA-Doppelsträngen zu unterscheiden. Über unterschiedliche Detektionsmöglichkeiten kann der Methylierungsstatus der zu untersuchenden Cytosin-Positionen bestimmt werden. Das Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose von Krebserkrankungen und anderer mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten sowie zur Prognose unerwünschter Arzneimittelwirkungen.

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/012853

International filing date: 09 November 2004 (09.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE  
Number: 103 53 419.9  
Filing date: 09 November 2003 (09.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 16 February 2005 (16.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**